

Efeitos ecológicos de substâncias químicas: uma nova perspetiva sobre velhas ferramentas

Ana Raquel Gonçalves Freches

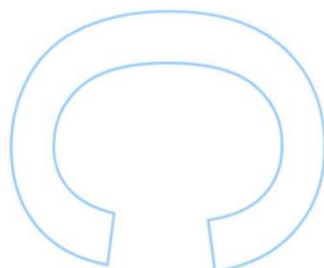
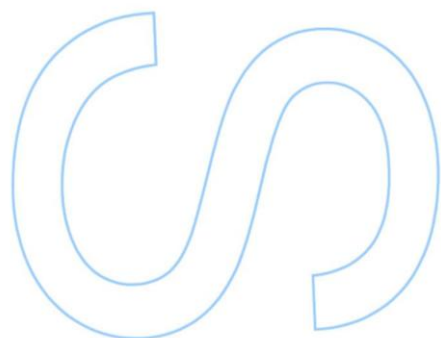
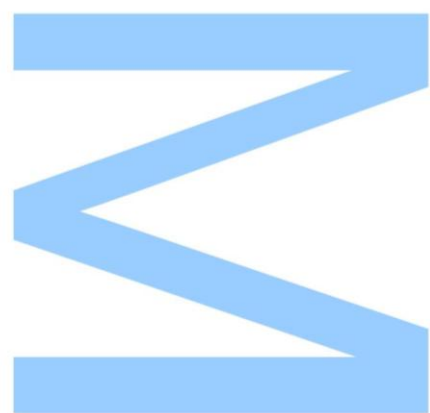
Mestrado em Ecologia, Ambiente e Território
Departamento de Biologia
2015

Orientador

Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Professora Auxiliar
Convidada do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Doutor Bruno Branco Castro, Professor Auxiliar Convidado do
Departamento de Biologia da Universidade do Minho

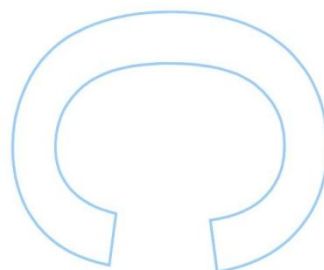
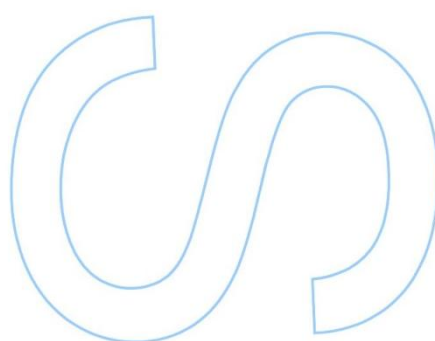
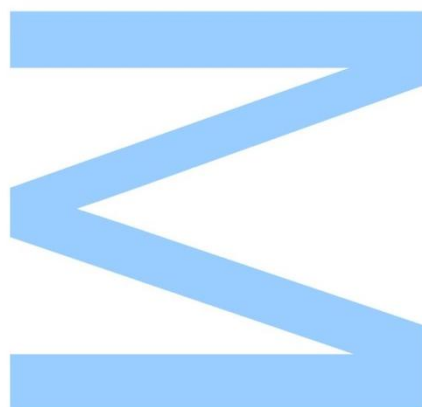




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia Ambiente e Território, da responsabilidade do Departamento de Biologia.

A presente tese foi desenvolvida sob a orientação científica da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da FCUP; e co-orientação científica do Doutor Bruno Branco Castro, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à minha orientadora Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes e coorientador Doutor Bruno Branco Castro pelo apoio, paciência, orientação e incentivo. Foram fundamentais para levar a bom porto este projeto.

À minha família, mãe e tios Manuel e Natália, que sempre me apoiaram e deram força e motivação para terminar esta importante etapa da minha vida.

Aos colegas de laboratório com quem me cruzei ao longo do ano.

E mais uma vez, um especial obrigado à minha orientadora Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes que de certa forma aceitou passar pelo desafio de orientar uma aluna sem formação base em biologia. Ensinando-me logo de início toda a parte prática do laboratório, a sua ajuda foi determinante para um bom desempenho. Pessoa que acreditou em mim desde o primeiro dia prometendo-me que teria material para uma tese. E aqui está ela!

RESUMO

A partir da década de 60, com o progresso tecnológico e industrial, houve um incremento da libertação de substâncias poluentes para o ambiente, principalmente provenientes das várias atividades humanas. Estes produtos químicos são frequentemente transportados (por lixiviação, etc.) para os sistemas aquáticos onde podem causar efeitos nefastos nos organismos (ex.: morte, atraso reprodutivo) e no funcionamento do ecossistema (ex.: alteração de funções ou processos ecológicos no qual os organismos intervêm). A Ecotoxicologia surgiu como resposta aos crescentes desafios da contaminação ambiental, satisfazendo a necessidade de avaliar os efeitos ecológicos dos tóxicos ao nível do indivíduo e da população. Os ensaios ecotoxicológicos assentam numa série de premissas para satisfazer as necessidades de padronização, contudo são insuficientes para avaliar efeitos toxicológicos na descendência de organismos expostos (i.e., efeitos multigeracionais). Perante este facto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos agudos e crónicos (na geração exposta e descendência) de três substâncias de referência (sulfato de cobre, dicromato de potássio e paracetamol) na espécie *Daphnia magna*. Relativamente à avaliação da toxicidade aguda, *D. magna* revelou maior sensibilidade ao sulfato de cobre (CE50 = 0,124 mg/L) seguida do dicromato de potássio (CE50 = 0,514 mg/L) e menor sensibilidade à exposição a paracetamol (CE50 = 4,750 mg/L). Os resultados da toxicidade crónica demonstraram que o sulfato de cobre e dicromato de potássio causam efeitos significativos a nível reprodutivo em *D. magna*, ao passo que o paracetamol causa efeitos menos pronunciados. Relativamente à avaliação dos efeitos sobre a descendência (F1), apenas o paracetamol evidenciou efeitos significativamente negativos em termos de desempenho reprodutivo; contudo, isto ocorreu a concentrações muito elevadas e improváveis de se verificarem no campo. Deste modo, pode-se afirmar que a exposição da geração parental (F0) aos compostos testados não causou efeitos substantivos na geração seguinte, não se conseguindo provar a existência de efeitos multigeracionais. Não obstante, o desenho experimental aqui proposto permite avaliar efeitos multigeracionais numa moldura temporal não superior à atualmente exigida nas normas internacionais padronizadas, através da realização simultânea do ensaio com a geração exposta (F0) e o ensaio de acompanhamento da geração F1 até ao primeiro evento reprodutivo.

Palavras-chave: *Daphnia magna*, sulfato de cobre, dicromato de potássio, paracetamol, ensaios ecotoxicológicos, parâmetros populacionais, efeitos geracionais

ABSTRACT

From the 1960s onwards, with technological and industrial advances, humans have caused and witnessed an increase in the release of toxic substances into the environment. These chemical substances are often transported (by lixiviation, etc.) to aquatic systems, where they may cause noxious effects in organisms (e.g., death, reproductive impairment) and ecosystem functioning (e.g., change in ecological processes or functions). Ecotoxicology was born as a response to the growing challenges posed by environmental contamination, satisfying the need of ecological effects assessment at the individual and population level. Toxicity tests are the main tools of this science, and they are based on a series of premises to satisfy the need of standardization and reproducibility. However, they are insufficient to evaluate toxicological effects in the progeny of exposed organisms (i.e. multigenerational effects). Bearing this in mind, this study's goal was to evaluate the acute and chronic effects (in the exposed generation and offspring) of three model substances (copper sulphate, potassium dichromate and paracetamol) in *Daphnia magna*. Relatively to the acute effects, *D. magna* was highly sensitive to copper sulphate ($EC_{50} = 0.124$ mg/L), followed by potassium dichromate ($EC_{50} = 0.514$ mg/L), and less sensitive to paracetamol ($EC_{50} = 4.750$ mg/L). Copper sulphate and potassium dichromate caused significant reproductive effects, whilst paracetamol caused only moderate effects in *Daphnia*. In what concerns the assessment of effects on the offspring of exposed mothers (i.e., multigenerational effects), only one of the three substances (paracetamol) elicited negative responses in terms of the reproductive performance of the F1 generation. However, this occurred at high concentrations, which are unlikely to occur in the environment. In this way, it is possible to claim that the exposure of the parental generation (F0) to the tested compounds did not cause substantial effects in the next generation (F1), and multigenerational effects were not proven for these substances. However, a part of the legacy of this thesis is the here-proposed experimental design, which allows evaluating multigenerational effects within the time frame of the standard reproduction assay, by carrying out the exposure of the parental generation to contaminants and – simultaneously – to accompanying the F1 generation until its first reproductive event.

Keywords: *Daphnia magna*, copper sulfate, potassium dichromate, acetaminophen, ecotoxicological assays, population parameters, generational effects

ÍNDICE

	Pág.
1. Introdução	2
1.1. Contexto histórico	2
1.1.1. Contaminação ambiental	2
1.1.2. Ecotoxicologia	7
1.2. Ferramentas de avaliação de risco	7
1.2.1. Ensaios de toxicidade	7
1.2.2. Novas perspectivas	10
1.3. Objetivos	10
2. Material e Métodos	13
2.1. Tóxicos-modelo	13
2.2. Manutenção da cultura de <i>Daphnia magna</i>	13
2.3. Ensaios ecotoxicológicos	16
2.3.1. Ensaio Agudo: determinação do valor de CE ₅₀	16
2.3.2. Ensaio Crônico: avaliação dos efeitos dos tóxicos-modelo a nível reprodutivo	17
2.3.3. Ensaio de performance da descendência: efeitos geracionais	19
2.4. Análise estatística	20
3. Resultados	22
3.1. Ensaios agudos	22
3.2. Ensaios crônicos	23
3.2.1. Efeitos reprodutivos e geracionais do sulfato de cobre	24
3.2.2. Efeitos reprodutivos e geracionais do dicromato de potássio	26
3.2.3. Efeitos reprodutivos e geracionais do paracetamol	28
4. Discussão	31
5. Referências Bibliográficas	36

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

		Pág.
Figura I1	Estimativas sobre o crescimento da população mundial com projeções até o ano de 2100.	2
Figura I2	DDT e Metil mercúrio, dois dos primeiros poluentes a chamar a atenção para as insuficiências do paradigma de diluição ("a solução para a poluição é diluição"). Eles aceleraram o surgimento do paradigma boomerang ("o que se deita fora, pode voltar para prejudicar"). Ambos regressaram para os seres humanos e para espécies selvagens pela transferência através das teias alimentares.	5
Figura I3	Consumo de medicamentos em Portugal, de 2001 a 2008 (unidades: número de embalagens vendidas e números de processos de pedido de autorização de introdução no mercado, AIMs).	5
Figura I4	Fotografias de A) Neonato de <i>D. magna</i> (ampliação 3.2x; escala 200 µm), e B) Fêmea adulta de <i>D. magna</i> com ovos (ampliação 1.0 x; escala 1mm).	9
Figura MM1	Fotografia da cultura e do sistema de cultivo da microalga verde <i>R. subcapitata</i> .	15
Figura MM2	Fotografia das culturas de <i>D. magna</i> armazenadas em câmara climática.	16
Figura MM3	Fotografia representativa da execução de um ensaio agudo.	17
Figura MM4	Fotografia representativa do ensaio crónico (F0 + F1).	19
Figura MM5	Imagem exemplificativa da medição do corpo de <i>D. magna</i> (ampliação 3.2x; escala 200 µm), desde o topo da cabeça até à base do espinho caudal.	20
Figura R1	Curvas de toxicidade das substâncias selecionadas e respetivos valores de CE ₅₀ (48 h) para <i>Daphnia magna</i> , bem como respetivos intervalos de confiança a 95% (IC95%).	23
Figura R2	Principais parâmetros da história de vida de <i>D. magna</i> após exposição crónica a uma gama de concentrações de Sulfato de Cobre (µg/L). As barras de erro correspondem ao erro padrão e * representa as diferenças estatísticas (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$) registadas entre o controlo (ctl) e as concentrações do tóxico.	25
Figura R3	Principais parâmetros da história de vida de <i>D. magna</i> após exposição crónica a uma gama de concentrações de Dicromato de Potássio (mg/L). As barras de erro correspondem ao erro padrão e * representa as diferenças estatísticas (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$) registadas entre o controlo (ctl) e as concentrações do tóxico.	27
Figura R4	Principais parâmetros da história de vida de <i>D. magna</i> após exposição crónica a uma gama de concentrações de Paracetamol (mg/L). As barras de erro correspondem ao erro padrão e * representa as diferenças estatísticas (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$) registadas entre o controlo (ctl) e as concentrações do tóxico.	29
Tabela MM1	Composição química do meio de cultura sintético ASTM hard water.	14
Tabela MM2	Condições de concentração para os ensaios agudos para as três substâncias químicas/tóxicos-modelo.	18
Tabela MM3	Condições de concentração para os ensaios crónicos para as três substâncias químicas/tóxicos-modelo.	18
Tabela R1	Tabela resumo da média e erro padrão de alguns parâmetros obtidos nos ensaios crónicos de Sulfato de Cobre, Dicromato de Potássio e Paracetamol em <i>D. magna</i> , para as respetivas concentrações.	23
Tabela R2	Tabela resumo da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) aplicada aos parâmetros quantificados em <i>D. magna</i> nos ensaios crónicos com sulfato de cobre (F – valor de F ; p – probabilidade; g.l. – graus de liberdade).	24

Tabela R3	Tabela resumo da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) aplicada aos parâmetros quantificados em <i>D. magna</i> nos ensaios crônicos com dicromato de potássio (F – valor de F ; p - probabilidade; g.l. - graus de liberdade).	26
Tabela R4	Tabela resumo da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) aplicada aos parâmetros quantificados em <i>D. magna</i> nos ensaios crônicos com paracetamol (F – valor de F ; p - probabilidade; g.l. - graus de liberdade).	28
Tabela D1	Tabela resumo de valores CE_{50} (48h) dos ensaios agudos calculados neste estudo e outros autores para <i>D. magna</i> .	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Do acrónimo em inglês: Analysis of Variance (Análise de Variância)
ASTM	Do acrónimo em inglês: American Society for Testing and Materials
CE ₅₀	Concentração Efetiva para 50% dos organismos
EC ₅₀	Do acrónimo em inglês: Effective Concentration for 50% of organisms
OCDE	Organização para a Cooperação para o Desenvolvimento Económico
USEPA	Da sigla em inglês: United States Environment Protection Agency

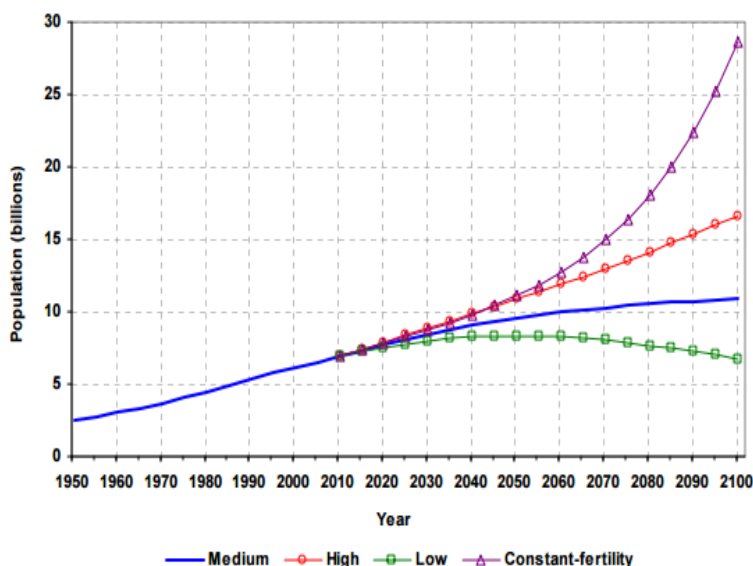
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto histórico

1.1.1. Contaminação ambiental

De acordo com a Revisão de 2012 das estimativas de população oficiais e projeções das Nações Unidas, a população mundial de 7200 milhões em meados de 2013 está projetada para aumentar em quase 1000 milhões de pessoas nos próximos doze anos, chegando a 8100 milhões em 2025, e para aumentar ainda mais para 9600 milhões em 2050 e 11000 milhões em 2100 (Fig. I1) (UN, 2013).



Source: Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat (2013). *World Population Prospects: The 2012 Revision*. New York: United Nations.

Figura I1 - Estimativas sobre o crescimento da população mundial com projeções até o ano de 2100. (Fonte: (UN, 2013))

Com o aumento significativo do crescimento da população mundial é urgente a necessidade de produzir alimento para sustentar a mesma, e para isso têm sido aplicadas estratégias para maximizar a produção de alimentos. Uma medida usada mundialmente para aumentar a produção alimentar é a utilização de agroquímicos com a capacidade de evitar pragas, reduzir a incidência de doenças (em humanos, plantas e outros animais), ou de maximizar a produção de culturas (Carvalho, 2006). Deste modo, a crescente contaminação do ambiente por xenobióticos, agentes químicos e físicos de origem antrópica, tem vindo a aumentar nas últimas décadas

(Pimentel, 1996). Estes xenobióticos – compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico que não são produzidos na natureza (Newman, 2009; Rand and Petrocelli, 1985) – entram continuamente nos ecossistemas, provocando desequilíbrios nos mesmos, uma vez que estes podem não ter a capacidade de os degradar na mesma proporção em que entram no ecossistema. Em resultado desta contaminação têm sido registados diversos efeitos adversos sobre os organismos, no funcionamento dos ecossistemas, e – em alguns casos – na saúde humana (Newman, 2009).

Quando a grave escassez de alimentos surgiu em muitos países em desenvolvimento no final dos anos 1950, foram feitos esforços para melhorar a produtividade das principais culturas agrícolas para ajudar a alimentar as pessoas nestes países (Pimentel, 1996). Portanto, o desafio principal seria de produzir mais alimentos e garantir a segurança alimentar, a fim de aliviar a pobreza e subnutrição e, ao mesmo tempo, para melhorar a saúde humana e o bem-estar (Carvalho, 2006). Nas décadas posteriores à Segunda Guerra Mundial, teve início um programa idealizado para aumentar a produção agrícola no mundo, denominado de Revolução Verde. Esse aumento aconteceu graças à propagação do uso de diversas tecnologias como os pesticidas, herbicidas e fertilizantes, assim como novas variedades de plantas de elevado rendimento. Então, historicamente, a contaminação ambiental no planeta intensificou-se a partir dos anos 60 e 70.

O sucesso da Revolução Verde foi possível devido ao desenvolvimento de cereais que suportavam elevados níveis de fertilizantes. Isto significava que, para um rendimento de sucesso, as colheitas tiveram que ser submetidas a um aumento das doses de produtos químicos (fertilizantes e pesticidas), produzidos principalmente a partir de combustíveis fósseis (Pimentel, 1996). Contudo, apesar do desenvolvimento agrícola ter trazido uma vida melhor para as populações, existe sempre o reverso da medalha. A utilização intensiva de pesticidas e fertilizantes tem um grande impacto negativo no meio ambiente. Estes efeitos são de vários níveis, desde danos nos terrenos agrícolas (solo), no ambiente aquático (água), na fauna e flora desses ecossistemas (direta ou indiretamente), até à destruição não intencional de predadores benéficos, aumentando assim a virulência de muitas espécies de pragas agrícolas (Wilson and Tisdell, 2001). No entanto, as consequências negativas de tal uso também podem facilmente atingir o ser humano provocando milhões de envenenamentos e vários milhares de mortes a cada ano, especialmente nos países em desenvolvimento

(Pimentel, 1996), contribuindo para uma crescente preocupação sobre os efeitos dos poluentes nos humanos (Newman, 2009).

Já na década de 60, a bióloga e ambientalista Rachel Carson lançou o livro histórico “Primavera Silenciosa (*Silent Spring*)”, onde chama a atenção do público para estas, e outras menos óbvias, consequências das acumulações dos pesticidas na natureza. O livro documentou os efeitos prejudiciais dos pesticidas no ambiente, particularmente em aves. Carson (1962) alertou para os efeitos do DDT (diclorodifeniltricloroetano) que causava a diminuição da espessura das cascas de ovos, resultando em problemas reprodutivos e em morte de várias espécies de aves. Carson (1962) demonstrou assim ao público que pesticidas como o DDT se podem acumular no ambiente em concentrações alarmantes, resultando em toxicidade direta e/ou em efeitos sub-letais para os organismos expostos (Newman, 2009) (ver Fig. I2). Para corroborar esta ideia, Newman (2009) explica que para além dos danos que o poluente pode provocar a nível celular até causar a morte do organismo, existe um efeito/dano entre estas duas consequências chamado de efeito sub-letal. Este efeito é observado normalmente quando um organismo é exposto a concentrações ou doses abaixo das que provocam a morte (Rand and Petrocelli, 1985). Após exposição a estas concentrações, os efeitos detetados são observados em importantes processos fisiológicos, como o crescimento, a reprodução, o comportamento, o desenvolvimento ou outros processos similares. Porém, os efeitos sub-letais podem não ser observados imediatamente, mas sim mais tarde, resultando de um efeito cumulativo. Nesse sentido, importa perceber se esses efeitos cumulativos se podem fazer sentir na geração seguinte. A realização de ensaios ecotoxicológicos com acompanhamento sobre as gerações seguintes à esposta poderá ser uma metodologia eficiente para avaliar efeitos adversos “silenciosos”, e que normalmente não são monitorizados na atual avaliação ecotoxicológica.

A avaliação de efeitos de xenobióticos sobre organismos alvo e não-alvo tem sido assim uma preocupação crescente entre os investigadores e entidades responsáveis na regulação e introdução de novas substâncias no mercado.

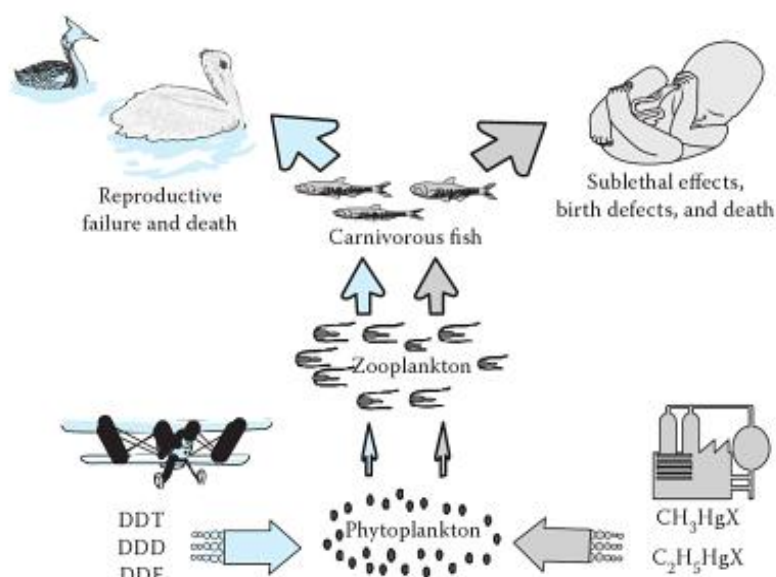


Figura I2 – DDT e Metil mercúrio, dois dos primeiros poluentes a chamar a atenção para as insuficiências do paradigma de diluição (“a solução para a poluição é diluição”). Eles aceleraram o surgimento do paradigma boomerang (“o que se deita fora, pode voltar para prejudicar”). Ambos regressaram para os seres humanos e para espécies selvagens pela transferência através das teias alimentares. (Fonte: (Newman, 2009))

A ameaça ambiental e de saúde humana dos xenobióticos não se resume aos químicos usados na agricultura. Uma outra classe de poluentes que tem ganho atenção nos últimos anos são os fármacos de uso humano e veterinário. Há já várias décadas que a medicina moderna disponibiliza ao ser humano tratamentos de patologias com base nestes compostos químicos, contribuindo para o aumento do consumo dos mesmos (Fig. I3).

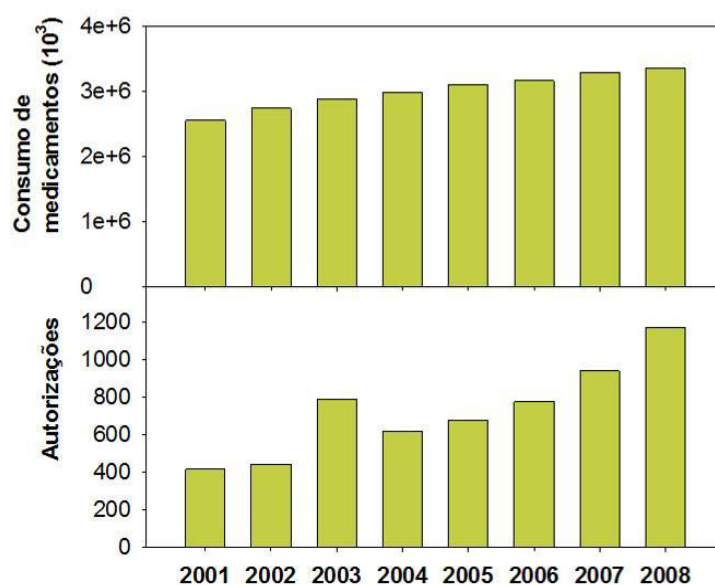


Figura I3: Consumo de medicamentos em Portugal, de 2001 a 2008 (unidades: número de embalagens vendidas e números de processos de pedido de autorização de introdução no mercado, AIMs). (Fonte: (Nunes, 2010))

Tendo em conta o surgimento de novas patologias mais resistentes também houve a necessidade de criar novos compostos e melhorar as suas capacidades de ação para combater as mesmas. Os medicamentos são compostos obtidos quimicamente pelos humanos com o objetivo de modificarem funções biológicas. Têm elevada biodisponibilidade, elevada potência farmacológica, são lipofílicos, são resistentes à biotransformação e são considerados como persistentes no meio ambiente, pois são também resistentes aos processos de degradação naturais (Nunes, 2010).

Apesar da necessidade destes compostos químicos, não houve uma análise das repercussões que estes teriam quando libertados no ambiente (Daughton and Ternes, 1999; Nunes, 2010). Acontece que a eliminação dos fármacos do organismo é feita preferencialmente por intermédio da urina e das fezes. No entanto, existem muitos fármacos que não conseguem ser removidos com sucesso através das estações de tratamento de águas residuais e assim estes compostos acabam por ter como destino os ecossistemas aquáticos, tanto marinhos como dulçaquícolas (Nunes, 2010).

A ocorrência de produtos farmacêuticos no ambiente aquático tem recebido uma atenção crescente nos últimos anos, no que diz respeito à sua persistência no ambiente, atividade biológica e efeitos diferentes em relação a organismos não-alvo (Oliveira et al., 2015). Fármacos tais como analgésicos, antibióticos, anti-epiléticos, anti-depressivos, beta-bloqueadores, os reguladores de lípidos do sangue e contraceptivos, são usados em grandes quantidades que conduzem à sua ocorrência no ambiente (Massarsky et al., 2011; Oliveira et al., 2015). Nunes (2010) destaca que estas substâncias são interessantes do ponto de vista ecotoxicológico pois podem interferir com alguns aspectos-chaves de organismos aquáticos expostos. As implicações podem ser sobre as estruturas biológicas, vias bioquímicas e processos de regulação, que resultam em efeitos tóxicos e dano irreversível a vários níveis.

Entre os produtos farmacêuticos que têm sido relatados em ambientes aquáticos, um assume um papel importante devido à sua toxicidade – o paracetamol. Este é um dos medicamentos mais utilizados em todo o mundo, usado como uma droga antipirética e analgésica em terapêutica humana (Nunes et al., 2014). Estes autores demonstraram ainda que a ecotoxicidade do paracetamol é altamente variável entre grupos taxonómicos e dentro do mesmo grupo taxonómico, sendo que os crustáceos – e particularmente os dafnídeos (pulgas-de-água) – são ecorrecetores sensíveis.

1.1.2. Ecotoxicologia

Ao longo dos anos, vários autores formaram as suas próprias definições sobre o que se entende por Ecotoxicologia ou Toxicologia Ambiental (Duffus, 1980; Forbes and Forbes, 1994; Hoffman, 1995; Moriarty, 1983; Truhaut, 1977). Algumas dessas definições excluía da discussão os humanos, exceto como sendo responsáveis pela fonte de contaminantes. Newman (2009) expõe essas diferentes definições e, de modo a conjugá-las numa só, definiu a ecotoxicologia ou toxicologia ambiental como a ciência dos contaminantes na biosfera e os seus efeitos nos constituintes da biosfera, incluindo os humanos.

Apesar da consciência e do aumento da preocupação das entidades responsáveis e da sociedade acerca dos impactos dos contaminantes sobre os organismos vivos e os ecossistemas, novos problemas ambientais continuam a surgir, sejam relacionados com a agricultura, derrames ou descargas ilegais, bem como a indústria. Todavia, não significa que o avanço e evolução das tecnologias industriais seja de certa forma prejudicial e incompatível com a saúde do ser humano e ambiente. Em vez disso, é importante ter em conta estes dois aspectos: i) há cerca de 60 anos, o paradigma da diluição (“a solução para a poluição é diluição”) falhou com graves consequências para a saúde humana e sistemas ecológicos e ii) o conhecimento científico na avaliação ecotoxicológica é neste momento fulcral para garantir a redução de impactos negativos sobre os ecossistemas (Newman, 2009). Nesse sentido, importa refletirmos sobre as ferramentas existentes para a avaliação dos efeitos ecológicos dos contaminantes (e seus riscos) e de que forma conseguimos extrair informação que melhore a nossa capacidade de prever os impactos dessas substâncias.

1.2. Ferramentas de avaliação de risco

1.2.1. Ensaio de toxicidade

Para avaliação do impacto de xenobióticos sobre a biota dos ecossistemas existem diversos ensaios padronizados que são usados pelos investigadores em ambiente laboratorial. Os ensaios ecotoxicológicos surgem como ferramentas amplamente utilizadas em trabalhos de monitorização e avaliação de impactos antropogénicos (de Paiva Magalhaes and Ferrao-Filho, 2008). O princípio de um ensaio de ecotoxicidade enquadra-se na exposição de organismos-modelo a várias

concentrações de uma substância e avaliação de efeitos dessa exposição sobre o organismo-modelo (ex: mortalidade, reprodução, stress oxidativo).

Os ensaios ecotoxicológicos classificam-se de acordo com o tempo de exposição e qual o efeito avaliado. Assim, podemos ter ensaios de toxicidade aguda, que avaliam efeitos após períodos curtos de exposição e normalmente avaliam mortalidade; e ensaios de toxicidade crónica, os quais avaliam os efeitos após exposições longas e os parâmetros avaliados poderão ser de diversos níveis (ex: reprodutivos, bioquímicos). Estes ensaios seguem protocolos padronizados desenvolvidos por organizações internacionais, como a OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico ou a ASTM - "American Society for Testing and Materials". De acordo com Soares and Calow (1993), é importante estabelecer procedimentos e regras padronizadas para os ensaios de toxicidade para que seja possível haver comparação entre estes, ou seja, de forma a garantir que as metodologias são aplicadas de forma uniforme, assegurando que os ensaios sejam executados de uma maneira rigorosa, em qualquer altura e em qualquer lugar. A padronização não é apenas para definir que ferramentas usar, também passa por selecionar qual organismo-teste para cada ensaio específico, quais os critérios de escolha desse organismo-teste, assim como outras estratégias que minimizem a variabilidade de resultados resultante de diferenças de procedimentos ou erros introduzidos pelo experimentador.

Daphnia magna é um dos organismo-modelo utilizado em ecotoxicologia aquática (Antunes et al., 2007). *Daphnia* é um género pertencente à Ordem Cladocera, que é um grupo de organismos comum nos ecossistemas lênticos (lagos e albufeiras), e desempenha um papel importante de consumidor primário nas teias alimentares. As suas respostas a pressões naturais e antropogénicas estão intimamente ligadas a condições bióticas (por exemplo, disponibilidade de alimento, presença de predadores) e abióticas (por exemplo, nutrientes, temperatura) do ambiente aquático (Antunes et al., 2004). Os organismos do género *Daphnia*, muitas vezes designados pelo nome comum de pulga-de-água (Fig. 14), possuem tamanho reduzido (adultos podem variar entre 1 a 5 mm) e alimentam-se por filtração não seletiva, exibindo uma dieta diversificada, obtendo o alimento que se encontra em suspensão na coluna de água (ex: bactérias, microalgas) (Ebert, 2005). As pulgas-de-água caracterizam-se por apresentarem elevada sensibilidade a diversos fatores de stress, possuírem um ciclo de vida curto com elevadas taxas de fecundidade, e o seu tamanho permite facilidade no manuseamento e manutenção de culturas laboratoriais. Além de todas estas

características, é possível controlar a sua variabilidade genética graças ao tipo de reprodução que utiliza maioritariamente (partenogénese), permitindo que os organismos das ninhadas de uma progenitora original sejam geneticamente idênticos entre eles e relativamente à progenitora (clones). Esta é uma vantagem importante em estudos ecotoxicológicos, pois possibilita a comparação de estudos laboratoriais (Lampert, 2006) aumentando assim a precisão da resposta do organismo, diminuindo a variabilidade entre os ensaios e consequentemente, aumentando a repetibilidade, a reprodutibilidade e a robustez dos dados obtidos (Barata et al., 2000). Tendo em conta estes fatores, *D. magna* é recomendada como um organismo padrão em teste laboratoriais de ecotoxicologia (ASTM, 1997; ISO, 1996, 2000; OECD, 2004, 2012).

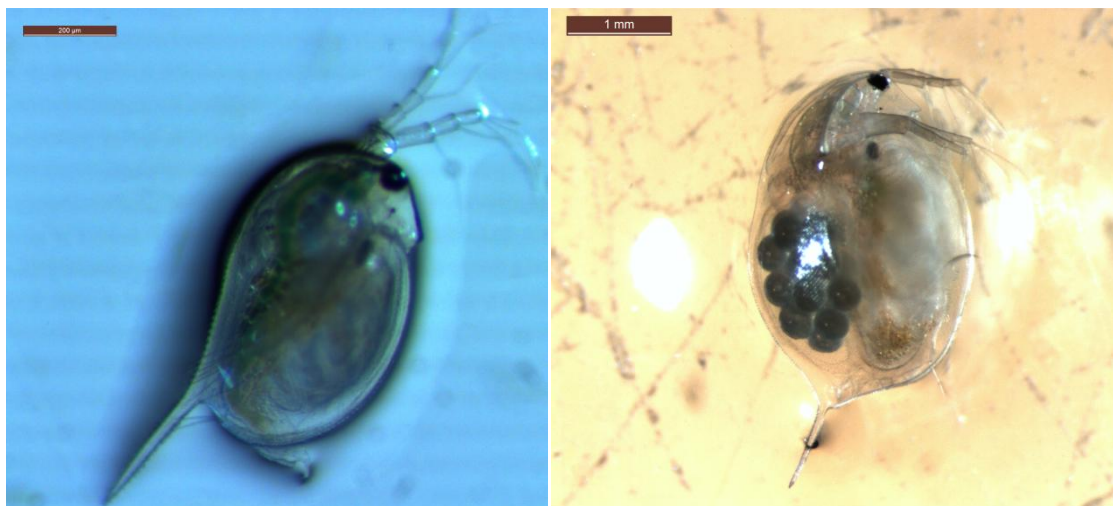


Figura I4 – Fotografias de A) Neonato de *D. magna* (ampliação 3.2x; escala 200 µm), e B) Fêmea adulta de *D. magna* com ovos (ampliação 1.0 x; escala 1mm). (Fotografia Raquel Freches)

Nos ensaios ecotoxicológicos padronizados com *D. magna* destacam-se dois testes com objetivos diferentes tendo em conta o tempo de exposição e o parâmetro a avaliar. O ensaio de toxicidade aguda (OECD, 2004) tem como objetivo avaliar os efeitos letais em organismos expostos a diferentes concentrações de substâncias químicas, num período curto (48 h). No caso de *Daphnia*, a mortalidade é avaliada como a ausência de movimentos natatórios após estimulação, sendo por isso mais correto falar de imobilização. A imobilização pode ser avaliada às 24 h, 48 h ou 96 h (dependendo da espécie utilizada e dos objetivos do ensaio) e os resultados são sempre comparados com os valores do controlo negativo (sem tóxico, e com imobilização <10%). Com a curva de toxicidade resultante é possível calcular a Concentração Efetiva para a qual 50% dos organismos apresentam efeitos – CE_{50} , isto

é, a concentração estimada que imobiliza 50% dos organismos expostos à substância nesse período de tempo.

Outro protocolo padronizado (OECD, 2012) refere as condições para a realização de ensaios crónicos, e o principal objetivo destes é avaliar os efeitos adversos em *D. magna* em termos de ciclo de vida (ex: reprodução, fecundidade, sobrevivência) após a exposição prolongada (21 dias) a substâncias químicas. Este ensaio permite avaliar os efeitos sobre o organismo que esteve exposto aos tóxicos durante todas as fases da sua vida (crescimento, maturidade e reprodução).

1.2.2. Novas perspetivas

Inúmeros estudos ecotoxicológicos foram já realizados com diversas substâncias químicas com o organismo-modelo em ecotoxicologia aquática, *Daphnia magna* (Loureiro et al., 2011; Nunes et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Santo, 2007). Nestes estudos, e de acordo com as normas dos protocolos padronizados, os parâmetros avaliados incidiram essencialmente nos efeitos sobre as populações expostas, ora pela avaliação na mortalidade através de ensaios agudos, ora pela avaliação de efeitos sobre a história de vida (ex. reprodução) na condução de ensaios crónicos. No entanto, existem poucos estudos que incidam sobre a avaliação dos efeitos na descendência (F1) de organismos inicialmente expostos (F0) a xenobióticos. Uma estratégia deste tipo permitiria o acompanhamento do desempenho da descendência com o objetivo de analisar a aptidão dos neonatos a longo prazo, avaliando os efeitos diretos e indiretos dos xenobióticos sobre a geração parental e durante o desenvolvimento embrionário da descendência. Deste modo, será possível prever quais os efeitos multigeracionais resultantes da exposição a xenobióticos.

1.3. Objetivos

O presente estudo teve como principal objetivo obter dados ecotoxicológicos para *Daphnia magna* Straus após exposição a três tóxicos representativos de grupos de xenobióticos comuns. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar se estas substâncias afetam também a reprodução e crescimento da descendência (geração F1) dos organismos inicialmente expostos (geração F0). Os tóxicos escolhidos para este estudo foram o Sulfato de Cobre, o Dicromato de Potássio (ambos utilizados no fabrico de biocidas) e o Paracetamol (um fármaco), que representam compostos com graus

de toxicidade, modos de ação, e utilizações antropogénicas diversas, mas todos de ampla utilização no seu nicho específico.

Os objetivos específicos do estudo consistiram em:

- i. Avaliar os efeitos da exposição aos tóxicos-modelo referidos anteriormente em *D. magna*, através de ensaios de toxicidade aguda e crónica;
- ii. Introduzir uma nova abordagem no ensaio de toxicidade crónica, de modo a obter informação sobre a geração seguinte e assim poder inferir sobre efeitos multigeracionais nomeadamente sobre a geração F1;
- iii. Averiguar se é possível avaliar os efeitos multigeracionais sem que com isso seja necessário ter um aumento muito significativo de esforço ou tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tóxicos utilizados

No decorrer do presente estudo foram utilizados três tóxicos para a realização de ensaios ecotoxicológicos. Os compostos selecionados foram: (i) o Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) composto amplamente utilizado como herbicida, fungicida e pesticida, e que é uma forma inorgânica de um metal comum (Loureiro et al., 2011); (ii) o Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), que é um composto oxidante habitualmente usado na indústria química e na produção de corantes, para além de poder ser usado como biocida (Loureiro et al., 2011); e (iii) o Paracetamol ($\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$), fármaco analgésico com características antipiréticas (Nunes et al., 2014). Para alguns autores (Coors et al., 2009; Nunes et al., 2014; Oliveira et al., 2015) estes compostos podem ser encarados como substâncias de referência, ou seja, químicos que têm uma ampla utilização em ensaios ecotoxicológicos e em que as respostas dos organismos são obtidas numa gama de concentrações conhecida, estando deste modo contemplados em protocolos padronizados, servindo de padrão/guia a ensaios futuros.

Para a realização das concentrações pretendidas de cada tóxico foram preparadas soluções stock, dissolvendo o reagente respetivo em meio de cultura do organismo-teste (ASTM hard water – ver abaixo; (ASTM, 1980)).

2.2. Manutenção da cultura de *Daphnia magna*

Neste estudo, o organismo-modelo utilizado foi o cladócer *Daphnia magna*. Para obter organismos para a realização de ensaios ecotoxicológicos é essencial manter as culturas em condições controladas em laboratório, para assim garantir a produção de neonatos com qualidade constante e em número suficiente. Nos ensaios realizados neste estudo utilizaram-se organismos provenientes do clone A, *sensu* (Baird et al., 1989a), mantidos em laboratório no Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. A cultura de *D. magna* foi mantida ao longo de várias gerações e para a manutenção das mesmas foi usado o meio de cultura sintético ASTM hard water (ASTM, 1980; USEPA, 2002). Este meio é preparado com água destilada e com os compostos químicos (em concentrações definidas) apresentados na Tabela MM1. As soluções 1, 2 e 3 são preparadas

previamente em soluções stock e armazenadas a 4°C. O meio de cultura ASTM é armazenado à temperatura ambiente após a sua preparação.

Tabela MM1 – Composição química do meio de cultura sintético ASTM hard water. (ASTM, 1980)

Fórmula Química	Quantidade de composto para solução stock (g/L)	Quantidade de composto para 2 L de solução concentrada (g)	Volume de solução concentrada para 20 L de meio de cultura (mL)
1 - NaHCO ₃	19,20	38,40	200
2 - MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,57	49,14	200
3 – KCl	0,80	1,60	200
4 - CaSO ₄ ·2H ₂ O (*)	2,40	Preparar no momento	
Tiamina HCl (B ₁)	0,150/100 mL	Um microtubo com 1 mL da mistura de vitaminas guardado no congelador	
Cianocobalamina (B ₁₂)	0,002/100 mL		
Biotina (H)	0,0015/100 mL		
pH = 7,8 ± 0,2			

(*) esta solução é preparada sempre que necessária, em que são dissolvidos 2,4 g em cerca 1,5 L de H₂O destilada, mantendo-se em agitação contínua durante o tempo necessário à sua dissolução. A solução é toda utilizada na preparação de 20 L de ASTM.

Uma vez que o meio sintético ASTM hard water é pobre em nutrientes, este deve ser enriquecido com a adição de um aditivo orgânico constituído por um extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Baird et al., 1989b). Este extrato fornece melhores condições nutritivas ao bom desenvolvimento e crescimento de *D. magna*. O aditivo orgânico foi preparado a partir da dissolução de liofilizado do extrato de alga marinha (1 g em 340 mL de H₂O destilada). Após dissolução completa, foi medida a absorvância da mistura a $\lambda=400$ nm numa diluição (1:10), sendo que o valor de absorvância obtido foi ajustado de forma a situar-se entre 0,620±0,010, de modo a garantir a constância da concentração do extrato cada vez que este é preparado. O extrato foi armazenado a 4°C para minimizar a proliferação bacteriana, em recipientes envoltos em papel de alumínio para evitar a fotodegradação. O volume de extrato adicionado era de 6,4 mL/L de meio de cultura (3200 µL/500 mL).

Para a alimentação dos organismos, foi necessário cultivar uma microalga verde em laboratório, *Raphidocelis subcapitata* (Fig. MM1). O meio de cultura para cultivar a microalga verde foi Woods Hole MBL (Stein et al., 1973). A preparação do meio MBL, bem como a sua transferência e inoculação com *R. subcapitata* foi sempre efetuada em condições de assepsia, para evitar contaminações externas. A cultura de *R. subcapitata* foi deixada em crescimento ao longo de uma semana, atingindo o seu pico ao sétimo dia. Nesse dia, a cultura foi utilizada para inocular novas culturas, sendo que o grosso do volume foi preparado para alimento. Para a preparação de

alimento, a suspensão algal foi centrifugada a 10 000 rpm, durante 5 min. O sobrenadante (meio de cultura e exsudados algais) foi desprezado e o resíduo ressuspenso com ASTM hard water. A suspensão obtida foi diluída numa proporção 1:10 (suspensão: ASTM) e lida a sua absorvância a 440 nm contra um branco contendo apenas ASTM hard water. A absorvância foi então acertada para valores entre 0,400 e 0,900, possibilitando o cálculo do volume de alimento a adicionar aos frascos de cultura de *D. magna* (através de uma reta de calibração pre-determinada). O objetivo foi ter uma suspensão padronizada de células de *R. subcapitata* para alimentar a cultura. O alimento adicionado correspondia sempre a uma concentração de $3,0 \times 10^5$ células mL^{-1} dia^{-1} (Antunes et al., 2007).



Figura MM1 – Fotografia da cultura e do sistema de cultivo da microalga verde *R. subcapitata*. (Fotografia Raquel Freches)

A manutenção de *D. magna* foi efetuada em culturas de grupo com cerca de 20 a 25 indivíduos em frascos de vidro com 500 mL de meio ASTM hard water. É importante não ultrapassar este limite de organismos por frasco, pois uma elevada densidade de indivíduos em cultura pode originar condições adversas aos organismos devido à limitação de espaço e alimento, prejudicando o normal desenvolvimento (crescimento e reprodução) do stock (inclusive pode dar origem à produção de machos). As culturas foram renovadas sempre com organismos nascidos entre a 3ª e

5ª ninhada e foram mantidas sob condições de incubação controladas (temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$) garantidas através de uma câmara climática (Fig. MM2). O meio foi renovado a cada 2 dias, transferindo as mães ou os neonatos para recipientes de vidro limpos contendo os volumes padronizados de ASTM hard water, alimento e extrato orgânico.



Figura MM2 – Fotografia das culturas de *D. magna* mantidas em câmara climática. (Fotografia Raquel Freches)

2.3. Ensaios ecotoxicológicos

Os procedimentos laboratoriais para a realização dos ensaios ecotoxicológicos agudos e crónicos seguiram os protocolos padronizados da “Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico” – OCDE (OECD, 2004, 2012).

Neste estudo foram realizados ensaios agudos e ensaios crónicos para cada substância química selecionada: Sulfato de Cobre, Dicromato de Potássio e Paracetamol. Todos os ensaios foram realizados com neonatos com menos de 24 horas de vida, preferencialmente nascidos entre a terceira e a quinta ninhada das culturas-mãe, garantindo assim que eram utilizados organismos em boas condições e de tamanho e sensibilidade homogêneos.

2.3.1. Ensaio Agudo: determinação do valor de CE_{50} (OECD, 2004)

Em cada ensaio agudo, neonatos de *D. magna* foram expostos a 9 concentrações dos diferentes tóxicos (ver Tabela MM2) e a um controlo negativo (sem exposição ao tóxico) em tubos de ensaio de vidro. A cada tubo de ensaio foi

adicionado um volume final de 10 mL de ASTM e o respetivo volume de tóxico. Em cada concentração, incluindo o controlo, foram expostos 20 indivíduos, divididos em 4 grupos de 5 organismos de *D. magna* (Fig. MM3). Durante os ensaios agudos, os organismos não foram alimentados e não foi fornecido o suplemento orgânico. Os organismos foram mantidos em condições idênticas às da manutenção das culturas (temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$). No decorrer do ensaio, às 24 h e 48 h, procedeu-se à observação dos organismos registando-se os que se encontravam imobilizados, para posterior determinação do valor de CE_{50} . Os resultados obtidos neste ensaio foram determinantes para a escolha da gama de concentrações a usar posteriormente nos ensaios para avaliação da toxicidade crónica (OECD, 2012).

Tabela MM2 - Concentrações utilizadas nos ensaios agudos para as três substâncias químicas selecionadas.

	Concentração da solução stock (mg/L)	Fator de diluição (x)	Gama de concentrações (mg/L)
Sulfato de Cobre	15	1,145	0,061 - 0,150
Dicromato de Potássio	18	1,250	0,336 - 2,000
Paracetamol	500	1,150	1,961 - 6,000

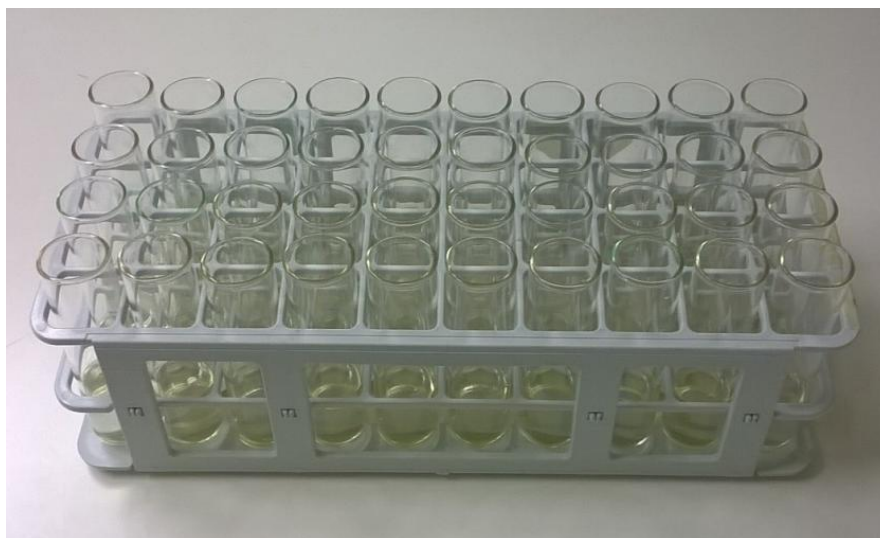


Figura MM3 – Fotografia representativa da execução de um ensaio agudo. (Fotografia Raquel Freches)

2.3.2. Ensaio Crónico: avaliação dos efeitos dos tóxicos-modelo a nível reprodutivo (OECD, 2012)

Os tóxicos usados para a avaliação dos efeitos crónicos foram os já descritos anteriormente e para os quais se obteve informação sobre a toxicidade aguda (ver acima).

Um sistema semi-estático foi iniciado utilizando 10 organismos expostos individualmente a cada concentração de tóxico (6 no total, ver Tabela MM3) e um controlo. Os recipientes do ensaio (10 por cada concentração) consistiram em frascos de vidro contendo 50 mL de ASTM e o volume de tóxico correspondente por concentração (Fig. MM4), extrato de algas e a dose alimentar exigida ($3,0 \times 10^5$ células $\text{mL}^{-1} \text{dia}^{-1}$). As concentrações dos tóxicos foram definidas com base no valor do CE_{50} dos ensaios agudos obtidos previamente.

Tabela MM3 - Concentrações utilizadas nos ensaios crónicos para as três substâncias químicas.

	Concentração da solução stock (mg/L)	Fator de diluição (x)	Gama de concentrações (mg/L)
Sulfato de Cobre	62,9	1,40	0,037 – 0,197
Dicromato de Potássio	100	1,30	0,05 - 0,20
Paracetamol	1500	1,25	1,3 - 4,0

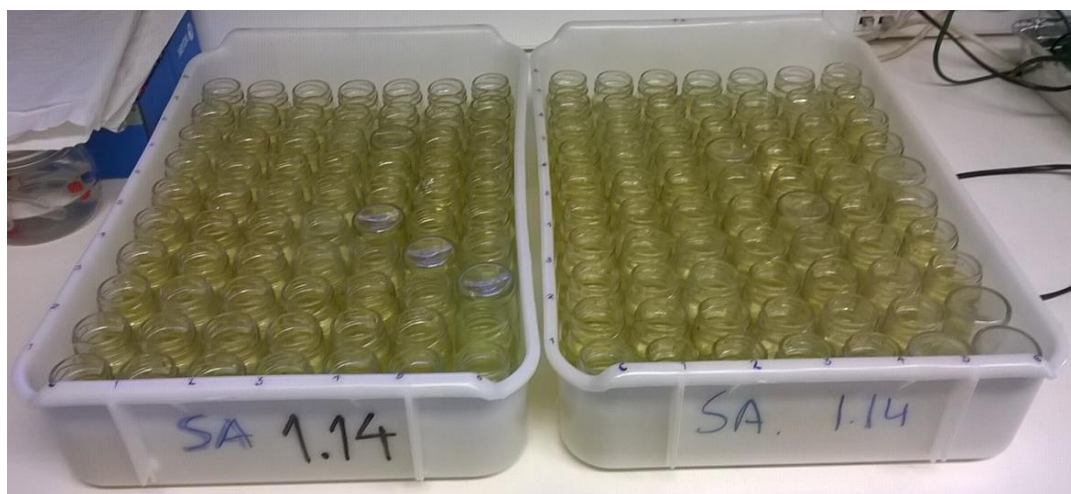


Figura MM4 – Fotografia representativa do ensaio crónico (F0 + F1). (Fotografia Raquel Freches)

As condições em que os ensaios crónicos foram realizados seguiram os mesmos requisitos que se observaram ao longo da manutenção das culturas. O meio de cultura e aditivo orgânico foram renovados de 2 em 2 dias e a alimentação foi diária. Os organismos foram observados diariamente até ao final do ensaio (ao longo de 21 dias) e registaram-se os seguintes parâmetros: mortalidade, dia do aparecimento dos primeiros ovos, a idade à primeira reprodução, a fecundidade à primeira ninhada (N1), o desempenho reprodutivo aos 21 dias, e tamanho médio dos neonatos (Fig. MM5) da primeira ninhada.

A sobrevivência e a fecundidade foram utilizadas na computação da taxa de incremento populacional (r) pela equação Euler-Lotka:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x$$

onde, r é a taxa de incremento populacional (dia^{-1}), x é a classe de idade em dias, l_x é a probabilidade de sobrevivência à idade x e m_x é a fecundidade na idade x . Para determinar a variabilidade associada a r foi utilizado o método Jackknife (Meyer et al., 1986).



Figura MM5 – Imagem exemplificativa da medição do corpo de *D. magna* (ampliação 3.2x; escala 200 μm), desde o topo da cabeça até à base do espinho caudal. (Fotografia Raquel Freches)

2.3.3. Ensaio de performance da descendência: efeitos geracionais

A primeira ninhada produzida nos ensaios crónicos foi utilizada para dar início a um novo ensaio, com o intuito de avaliar os efeitos da exposição parental aos tóxicos na descendência (geração F1). A primeira ninhada da geração parental (F0) ocorreu em média pelo 10º dia de ensaio, e os neonatos produzidos foram isolados e transferidos para meio de cultura limpo (e sem tóxicos) nas primeiras 24 h de vida (Fig. MM4). Da primeira ninhada de cada organismo exposto retirou-se aleatoriamente 1 neonato para um novo sistema de ensaio, isento de qualquer concentração de tóxico (apenas em meio de cultura ASTM hard water + extrato). O procedimento experimental da manutenção do ensaio da F1 foi idêntico ao descrito para o ensaio da F0, com mudança do meio feita de 2 em 2 dias e observação e alimentação diária

($3,0 \times 10^5$ células mL^{-1} dia^{-1}). Ao contrário do ensaio da F0, este teve apenas a duração de 12 dias com o intuito de acompanhar a descendência F1 até ao nascimento da primeira ninhada (geração F2). Os parâmetros avaliados ao longo do ensaio foram o dia do aparecimento dos primeiros ovos, a idade à primeira reprodução, a fecundidade da N1, o output reprodutivo aos 12 dias e a taxa de incremento populacional (ver descrição acima).

2.4. Análise estatística

Os valores de CE_{50} e respetivos intervalos de confiança a 95% foram calculados para os diferentes tóxicos a partir dos resultados obtidos nos ensaios de exposição aguda, utilizando uma análise Probit (Finney, 1971). Os diferentes parâmetros avaliados após exposição crónica foram analisados através de uma análise de variâncias de uma via (ANOVA) para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, quer para a geração parental (F0), quer para a descendência (F1). Sempre que se verificavam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foi realizado um teste de comparações múltiplas de Dunnett para avaliar as diferenças relativamente à situação controlo.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio agudo

A Fig. R1 apresenta as curvas de toxicidade e os valores de CE_{50} (às 48 h) referentes à toxicidade aguda dos tóxicos Sulfato de Cobre, Dicromato de Potássio e Paracetamol para *D. magna*, e os seus intervalos de confiança a 95%. Os resultados indicaram que ocorreu toxicidade aguda para os vários tóxicos, sendo que *D. magna* manifestou maior sensibilidade ao Sulfato de Cobre (0,124 mg/L), seguido do Dicromato de Potássio (0,514 mg/L). O Paracetamol foi a substância menos tóxica, com um valor de CE_{50} acima de 4 mg/L.

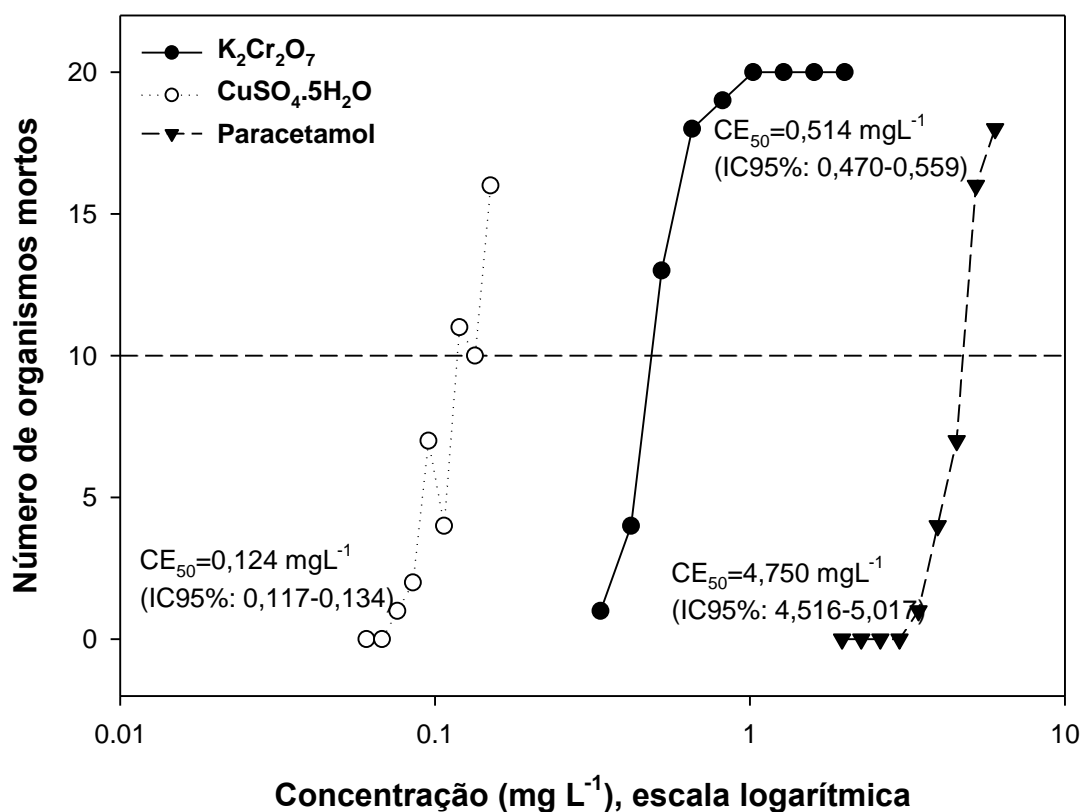


Figura R1 – Curvas de toxicidade das substâncias selecionadas e respetivos valores de CE_{50} (48 h) para *Daphnia magna*, bem como respetivos intervalos de confiança a 95% (IC95%).

3.2. Ensaios crónicos

Nas Fig. R2, R3 e R4 e Tabelas R1 e R2 estão representados os resultados obtidos nos ensaios crónicos com *D. magna* após exposição a diferentes concentrações dos tóxicos utilizados no presente estudo. Para a validação do ensaio crónico (OECD, 2012) os seguintes critérios de desempenho foram cumpridos para o controlo negativo: (i) a mortalidade dos progenitores não foi superior a 20% no final do teste e (ii) ocorreu produção de mais de 60 neonatos viáveis por progenitora no final do ensaio.

A mortalidade dos organismos foi aumentando ao longo do incremento das concentrações testadas, e foi particularmente elevada nos ensaios com o Sulfato de Cobre e o Dicromato de Potássio (Tabela R1). Ainda na Tabela R1, foi possível observar que o tamanho dos neonatos da 1ª ninhada e o dia do aparecimento dos ovos da geração parental (F0) entre as várias concentrações, foram parâmetros onde não se observaram diferenças. A análise aos parâmetros reprodutivos para a geração parental (F0) e sua descendência (F1) é apresentada de seguida, para cada um dos compostos testados.

Tabela R1 - Tabela resumo da média e erro padrão de alguns parâmetros obtidos nos ensaios crónicos de Sulfato de Cobre, Dicromato de Potássio e Paracetamol em *D. magna*, para as respetivas concentrações.

Sulfato de Cobre (mg/L)	ctl	0,037	0,051	0,072	0,100	0,140	0,197
Mortalidade % F0	10	90	60	70	80	90	100
Tamanho neonatos N1 F0 (mm)	0,744±0,01	0,764±0,01	0,773±0,01	0,757±0,01	0,778±0,01	0,772±0,01	0,680
Dia do aparecimento dos ovos F0	5±0	6±1	6±0	6±0	6±0	5±0	5
Dicromato de Potássio (mg/L)	ctl	0,05	0,07	0,09	0,12	0,15	0,20
Mortalidade % F0	0	30	50	80	90	90	100
Tamanho neonatos N1 F0 (mm)	0,671±0,02	0,698±0,01	0,692±0,03	0,722±0,01	0,693±0,02	0,724±0,01	0,717±0,01
Dia do aparecimento dos ovos F0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
Paracetamol (mg/L)	ctl	1,3	1,6	2,0	2,5	3,2	4,0
Mortalidade % F0	0	0	0	0	20	10	20
Tamanho neonatos N1 F0 (mm)	0,745±0,01	0,749±0,01	0,748±0,01	0,758±0,01	0,733±0,01	0,725±0,02	0,712±0,02
Dia do aparecimento dos ovos F0	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0	7±0	7±0

3.2.1. Efeitos reprodutivos e geracionais do sulfato de cobre

Numa primeira análise aos restantes parâmetros reprodutivos e populacionais, pode-se observar que o Sulfato de Cobre apresenta efeitos negativos sobre o organismo em estudo. Os resultados mostram que, apenas nas concentrações mais reduzidas de Sulfato de Cobre (0,037 e 0,051 mg/L), se registou um atraso reprodutivo significativo e um decréscimo no desempenho reprodutivo (Fig. R2 e Tabela R2). Este decréscimo foi observado quer aos 21 dias, quer aos 12 dias (período de tempo comparável para ambas as gerações). Na taxa de incremento populacional registou-se um decréscimo significativo apenas na concentração mais alta testada, 0,197 mg/L (Fig. R2 e Tabela R2). Não foram encontradas diferenças para a fecundidade da N1, ou seja, o número de neonatos nascidos na primeira ninhada não foi significativamente afetado.

Para os dados referentes à geração F1, em nenhum parâmetro reprodutivo se verificaram diferenças relativamente ao controlo (Fig. R2 e Tabela R2), demonstrando assim que os efeitos da exposição ao Sulfato de Cobre não são transmitidos para a geração seguinte.

Tabela R2 - Tabela resumo da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) aplicada aos parâmetros quantificados em *D. magna* nos ensaios crónicos com sulfato de cobre (*F* – valor de *F*; *p* – probabilidade; g.l. – graus de liberdade).

Parâmetros		<i>F</i>	<i>p</i>	g.l.
Sulfato de Cobre				
F0	Fecundidade	0,564	0,727	5, 34
	Output Reprodutivo 21 dias	8,526	<0,001	6, 63
	Output Reprodutivo 12 dias	5,037	<0,001	6, 63
	Idade à 1ª reprodução	4,321	0,004	5, 34
	Taxa de incremento populacional (r)	5,491	<0,001	6, 62
F1	Fecundidade	1,028	0,418	5, 32
	Output Reprodutivo 12 dias	1,294	0,291	5, 32
	Idade à 1ª reprodução	4,053	0,006	5, 32
	Taxa de incremento populacional (r)	0,464	0,800	5, 33

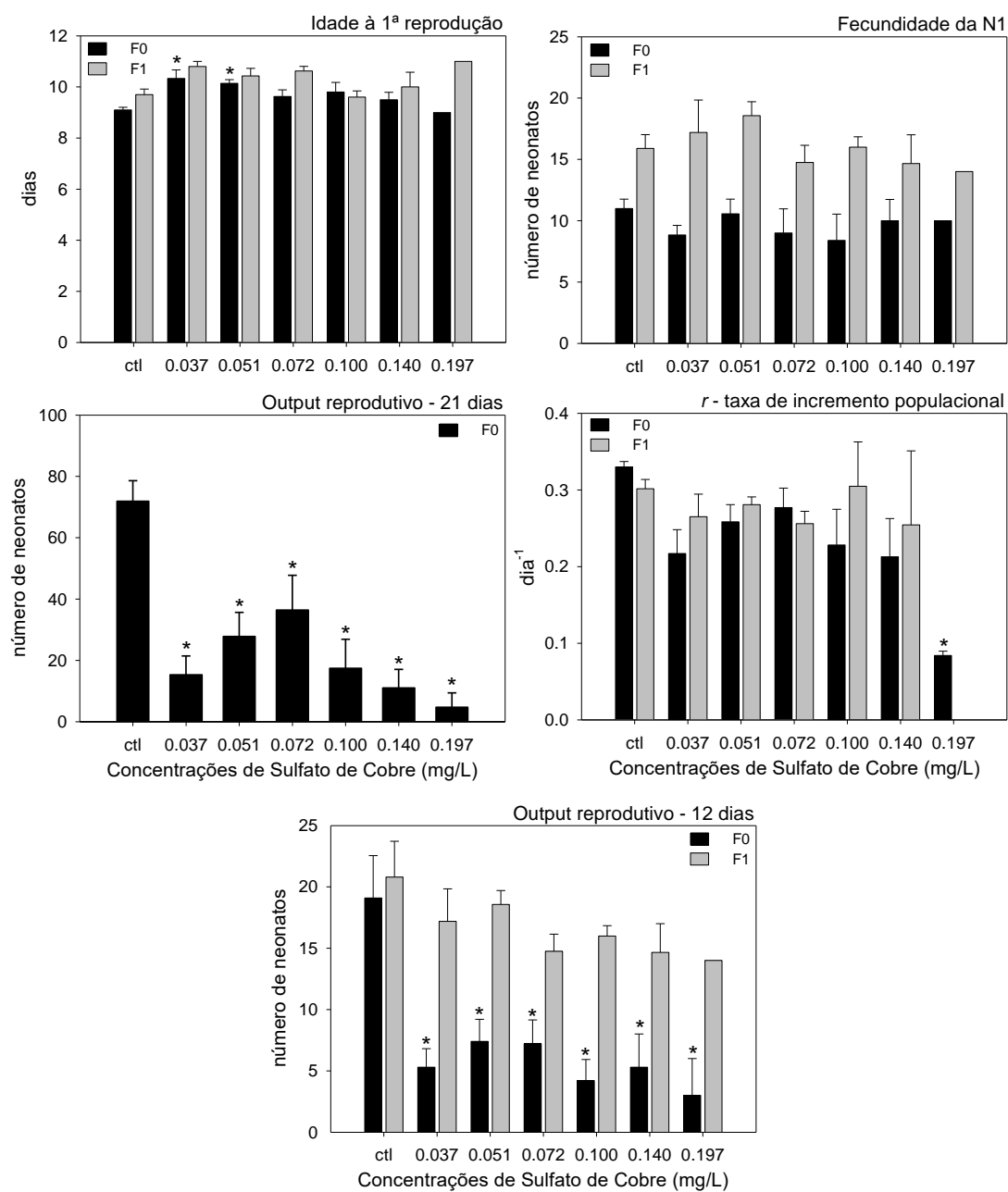


Figura R2 – Principais parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição crónica a uma gama de concentrações de Sulfato de Cobre (mg/L). As barras de erro correspondem ao erro padrão e * representa as diferenças estatísticas (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$) registadas entre o controlo (ctl) e as concentrações do tóxico.

3.2.2. Efeitos reprodutivos e geracionais do dicromato de potássio

Os resultados do ensaio crónico de *D. magna* exposta a Dicromato de Potássio estão representados na Fig. R3. A idade à 1ª reprodução e a fecundidade da primeira ninhada foram parâmetros que não foram afetados pela exposição ao Dicromato de Potássio, para ambos os ensaios desenvolvidos (Fig. R3 e Tabela R3). O output reprodutivo aos 21 dias confirmou que a exposição ao Dicromato de Potássio provoca efeitos adversos na reprodução, ao diminuir significativamente a descendência produzida a partir dos 0.05 mg/L (Fig. R3 e Tabela R3). Aos 12 dias, este efeito negativo só é sentido a partir dos 0.20 mg/L. A sobrevivência e a reprodução são parâmetros que estão integrados na taxa de incremento populacional, e os resultados após exposição ao Dicromato de Potássio mostraram uma diminuição significativa deste parâmetro para todas as concentrações testadas (Fig. R3 e Tabela R3).

À semelhança do que se observou para o Sulfato de Cobre, os parâmetros reprodutivos observados na geração F1 não foram significativamente diferentes do controlo (Fig. R3 e Tabela R2). Deste modo, parece não haver efeitos multigeracionais do dicromato de potássio.

Tabela R3 - Tabela resumo da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) aplicada aos parâmetros quantificados em *D. magna* nos ensaios crónicos com dicromato de potássio (*F* – valor de *F*; *p* - probabilidade; g.l. - graus de liberdade).

Parâmetros		<i>F</i>	<i>p</i>	g.l.
Dicromato de Potássio				
F0	Fecundidade	1,981	0,082	6, 63
	Output Reprodutivo 21 dias	38,483	<0,001	6, 63
	Output Reprodutivo 12 dias	3,009	0,012	6, 63
	Idade à 1ª reprodução	2,148	0,060	6, 63
	Taxa de incremento populacional (r)	8,413	<0,001	6, 63
F1	Fecundidade	1,519	0,189	6, 55
	Output Reprodutivo 12 dias	2,432	0,035	6, 63
	Idade à 1ª reprodução	1,082	0,385	6, 55
	Taxa de incremento populacional (r)	1,796	0,114	6, 63

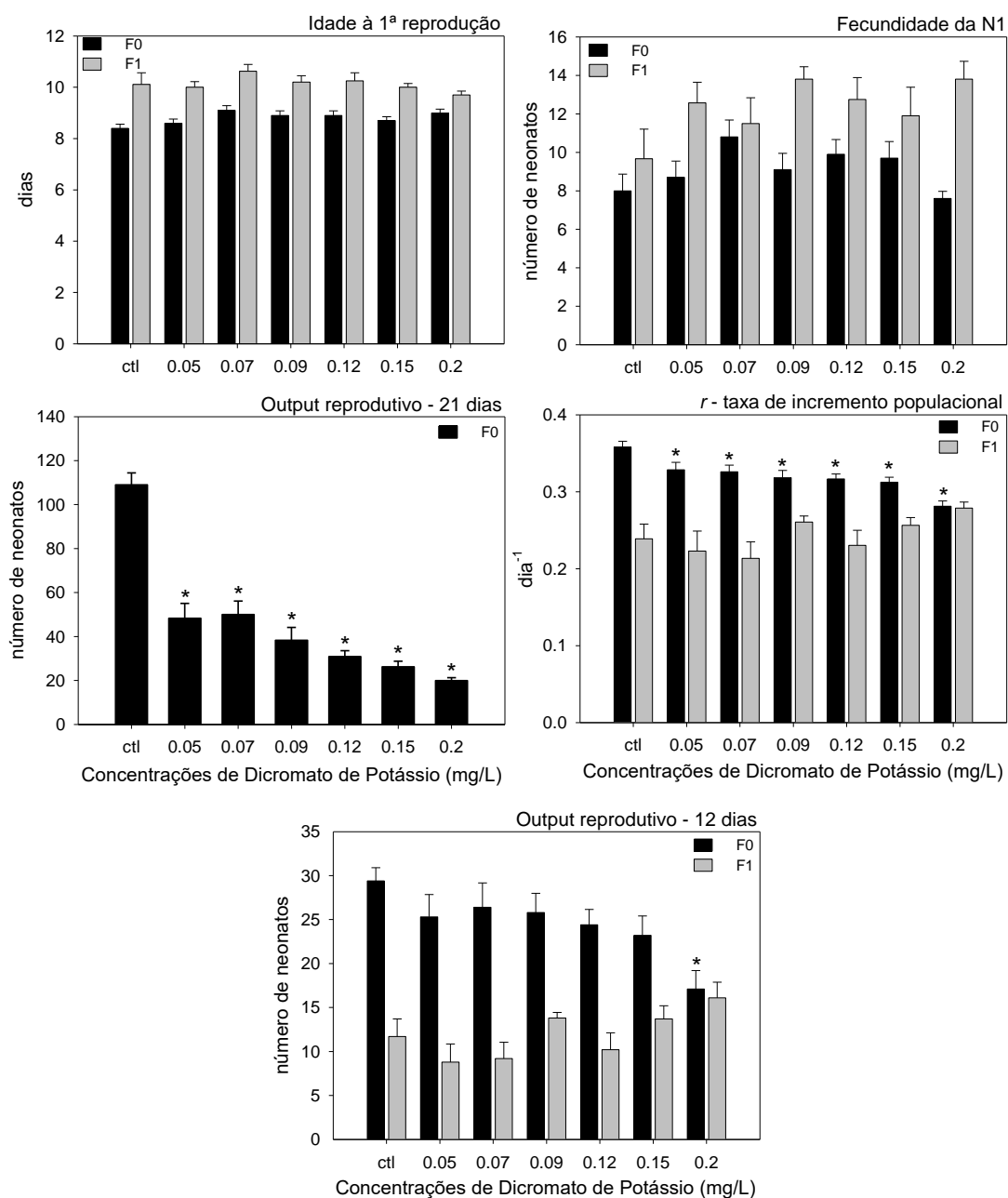


Figura R3 - Principais parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição crónica a uma gama de concentrações de Dicromato de Potássio (mg/L). As barras de erro correspondem ao erro padrão e * representa as diferenças estatísticas (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$) registadas entre o controlo (ctl) e as concentrações do tóxico.

3.2.3. Efeitos reprodutivos e geracionais do paracetamol

Na Figura R4 podem observar-se os resultados do ensaio crónico de *D. magna* a Paracetamol. Relativamente à idade da 1ª reprodução, ocorreu um atraso significativo para os organismos expostos (F0) nas concentrações de 2 a 4 mg/L (Fig. R4 e Tabela R4). A fecundidade da N1 não foi afetada, mas o desempenho reprodutivo aos 12 dias foi afetado a partir de 2 mg/L (Fig. R4 e Tabela R2). Observando a taxa de incremento populacional (r), registou-se uma diminuição significativa a partir da concentração de 2 mg/L (Fig. R4 e Tabela R4). Contrariamente aos outros dois tóxicos utilizados, o ensaio com o Paracetamol não revelou diferenças significativas no output reprodutivo ao fim de 21 dias de ensaio.

No ensaio com a F1, a idade à 1ª reprodução foi significativamente maior na concentração de 4 mg/L (Fig. R4 e Tabela R4), mas em mais nenhum parâmetro se verificou um efeito negativo da exposição prévia ao paracetamol. No entanto, parece ter havido efeitos adversos no desempenho reprodutivo da F1 (redução não significativa de cerca de 50% relativamente ao controlo), embora apenas na última concentração (Fig. R4 e Tabela R4).

Tabela R4 - Tabela resumo da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) aplicada aos parâmetros quantificados em *D. magna* nos ensaios crónicos com paracetamol (*F* – valor de *F*; *p* – probabilidade; g.l. – graus de liberdade).

Parâmetros		<i>F</i>	<i>p</i>	g.l.
Paracetamol				
F0	Fecundidade	2,486	0,032	6, 62
	Output Reprodutivo 21 dias	2,298	0,045	6, 63
	Output Reprodutivo 12 dias	34,219	<0,001	6, 63
	Idade à 1ª reprodução	12,743	<0,001	6, 62
	Taxa de incremento populacional (r)	19,327	<0,001	6, 63
F1	Fecundidade	0,269	0,949	6, 57
	Output Reprodutivo 12 dias	3,090	0,010	6, 61
	Idade à 1ª reprodução	6,291	<0,001	6, 57
	Taxa de incremento populacional (r)	3,497	0,005	6, 61

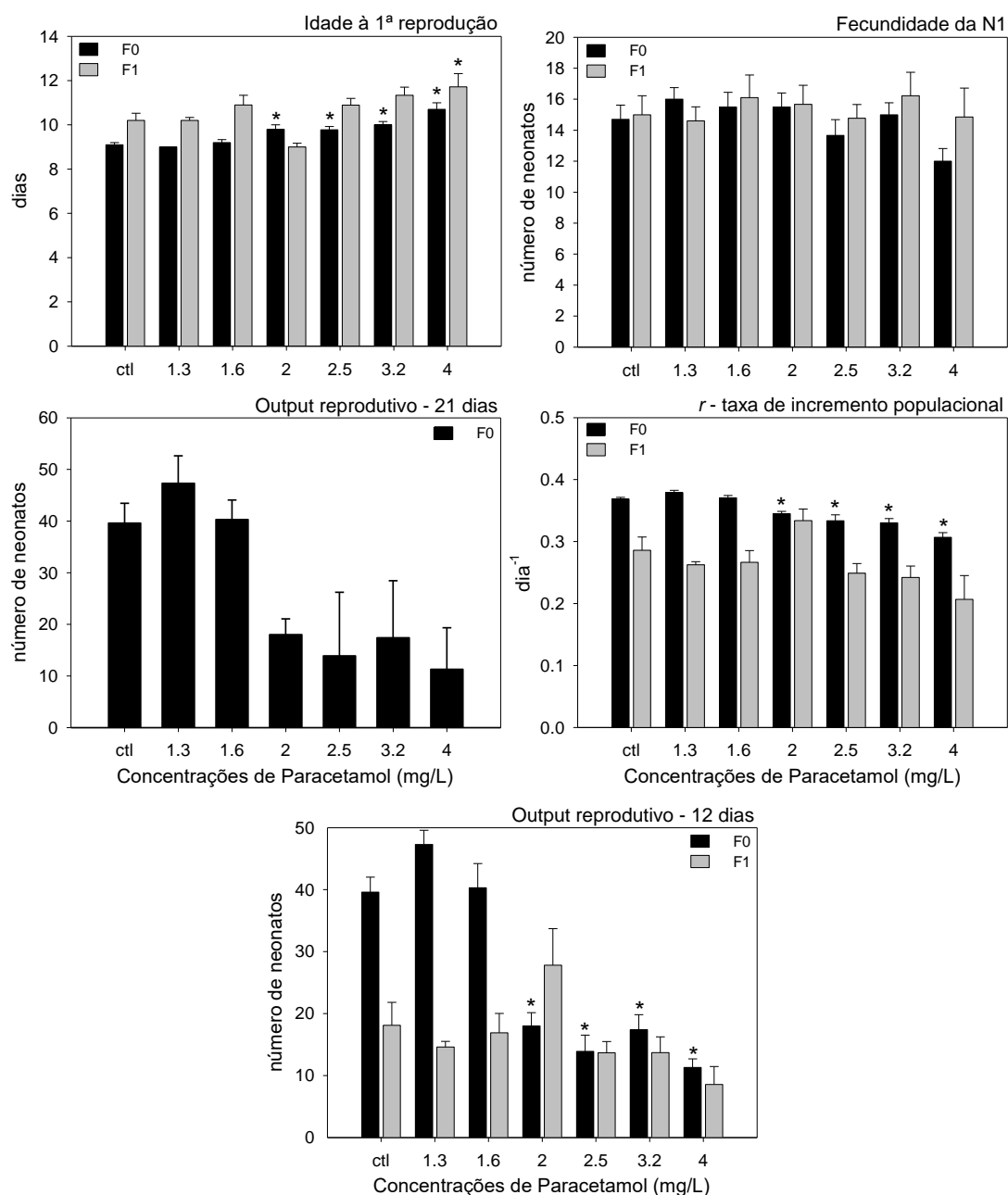


Figura R4 - Principais parâmetros da história de vida de *D. magna* após exposição crónica a uma gama de concentrações de Paracetamol (mg/L). As barras de erro correspondem ao erro padrão e * representa as diferenças estatísticas (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$) registadas entre o controlo (ctl) e as concentrações do tóxico.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que as concentrações ecologicamente relevantes dos tóxicos avaliados estes se verificaram nocivos para a espécie *Daphnia magna*. Contudo, no caso do paracetamol, as concentrações para as quais se verificaram efeitos nocivos são ambientalmente improváveis (a literatura reporta concentrações ambientais inferiores a 100 µg/L; (Kolpin et al., 2002; Roberts and Thomas, 2006; Ternes, 1998)). Mais importante ainda, este trabalho revelou que nenhum dos três compostos testados produz efeitos evidentes na descendência (F1) dos organismos expostos (F0).

Os valores do CE₅₀ obtidos neste estudo são comparáveis a outros estudos com *D. magna*, para os três tóxicos (ver Tabela D1).

Tabela D1 – Tabela resumo de valores CE₅₀ (48h) dos compostos testados para *D. magna* quantificados neste estudo e por outros autores.

Espécie	Sulfato de Cobre (mg/L)	Dicromato de Potássio (mg/L)	Paracetamol (mg/L)	Referência
<i>D. magna</i>	0,124	0,514	4,75	Este estudo
<i>D. magna</i>	0,094	0,639		Loureiro et al. (2011)
<i>D. magna</i>			4,7	Nunes et al. (2014)
<i>D. magna</i>			2,83	Oliveira et al. (2015)
<i>D. magna</i>			9,2	Kühn et al. (1989)
<i>D. magna</i>			11,85	Kim et al. (2007)
<i>D. magna</i>	0,118-0,208			Bossuyt et al. (2004)
<i>D. magna</i>		0,55-1,2		Coors et al. (2009)

Apesar de algumas diferenças observadas, a importância dos valores de CE₅₀ é a possibilidade de estabelecer uma comparação direta no que toca ao stress agudo e sensibilidade perante o composto em estudo (Oliveira et al., 2015). Deste modo, os nossos resultados confirmaram que *D. magna* foi mais sensível ao Sulfato de Cobre, evidenciando que dos três compostos é aquele que se apresenta mais tóxico para *D. magna*, afetando-a negativamente mesmo em concentrações reduzidas (a partir de 37 µg/L = 9 µg Cu/L em termos reprodutivos). Apesar deste resultado, existem estudos anteriores que documentam uma toxicidade ligeiramente maior para o Sulfato de Cobre, mais precisamente no estudo de Loureiro et al. (2011). No entanto – e conforme documentado por Loureiro et al. (2011) – é usual haver diferenças de

toxicidade entre estudos, como consequência de pequenas diferenças nos procedimentos das culturas ou da qualidade do alimento (algas). No caso concreto do ensaio crónico, a ação quelante do extrato orgânico (que é adicionado como aditivo ao meio de cultura) pode justificar algumas diferenças de toxicidade entre estudos, em virtude da proveniência e composição química do extrato orgânico não ser uniforme. Mais ainda, o papel quelante do extrato originou a que as concentrações mais altas utilizadas no ensaio crónico fossem mais elevadas (gama 0,037-0,197 mg/L) do que as utilizadas no ensaio agudo (0,061-0,150 mg/L).

O CE_{50} às 48 h obtido para o Dicromato de Potássio, 0,514 mg/L, é semelhante ao do estudo de Coors et al. (2009) que atingiu valores entre 0,55 e 1,2 mg/L. Já o estudo de Loureiro et al. (2011) originou um valor ligeiramente mais elevado, CE_{50} = 0,639 mg/L. O protocolo padronizado (OECD, 2004) utiliza o dicromato de potássio como substância de referência e refere que o CE_{50} às 24 h para este composto deverá estar compreendido entre 0,60 e 2,1 mg/L. Neste estudo, o CE_{50} às 24 h foi de 0,81 mg/L, o que valida a sensibilidade do stock de *Daphnia* usado nos ensaios.

Neste estudo, o paracetamol foi o composto químico que mostrou ser menos tóxico para *D. magna*, obtendo um valor de CE_{50} comparável com o valor do estudo de Nunes et al. (2014). Porém outros valores resultantes de estudos anteriores mostram grandes diferenças, demonstrado em Oliveira et al. (2015) com uma diferença de metade; Kühn et al. (1989) e Kim et al. (2007) de praticamente 3 vezes o valor deste estudo. Nunes et al. (2014) discutiram esta variabilidade em função da variação no estado fisiológico e nutricional dos animais, revelando preocupação com a incerteza associada na análise de risco deste fármaco.

Estes resultados mostram que este cladóceros é uma espécie bastante sensível aos efeitos destes três compostos químicos, o que é relevante atendendo à posição fulcral que esta espécie ocupa na base da teia alimentar, sendo um consumidor primário. Loureiro et al. (2013) discutem as implicações de alterações negativas em populações desta espécie-chave dos ambientes pelágicos de lagos e albufeiras, em função do seu papel central na regulação da biomassa fitoplanctónica. Entre outras preocupações, estes autores apontam a desregulação da herbivoria como causa da transição para um estado de equilíbrio alternativo com água turva e com elevada produtividade primária.

Particularmente preocupante foi o facto de todos os tóxicos afetarem os parâmetros da história de vida com o aumento da concentração. Com os resultados dos ensaios de toxicidade crónica procurou-se perceber se os mesmos teriam

repercussões negativas a longo prazo, mais propriamente a nível populacional (crescimento e reprodução) através da avaliação da descendência (F1) da população (F0) anteriormente exposta. Desta forma, o mesmo ensaio permitiu avaliar as consequências nos organismos expostos, mas também ir mais além e avaliar se estes efeitos são transientes (i.e. afetam apenas a geração exposta) ou se podem ter repercussões na geração seguinte.

No ensaio com o Sulfato de Cobre foi evidente que nas concentrações mais altas houve maiores danos em *D. magna*. Este tóxico afetou de forma negativa o desenvolvimento, levando a alterações reprodutivas mesmo nas concentrações mais baixas que se utilizaram neste ensaio. A proximidade entre os efeitos agudos (morte) e crónicos acarretou alguma sobreposição entre mortalidade e efeitos reprodutivos, o que levou a que, por exemplo, todos os indivíduos da última concentração morressem antes do fim do ensaio. Este perfil foi também verificado por Loureiro et al. (2011). Não houve repercussões da exposição parental no desempenho da descendência, o que descarta a ideia de efeitos multigeracionais.

Para o Dicromato de Potássio também se constatou que é uma substância que afeta o nível reprodutivo e os resultados mostram isso mesmo em todas as concentrações testadas. Do ponto de vista ambiental, existe preocupação a partir de 5 µg/L deste composto, o que é um valor relativamente baixo e provável de ocorrer em águas superficiais, embora tenhamos de atender aos vários processos que alteram a sua disponibilidade, solubilidade e especiação (ver (Ellis et al., 2002)).

Relativamente aos dados de toxicidade crónica do Paracetamol, observou-se que nas concentrações testadas, 1,3 – 4,0 mg/L, não houve efeitos adversos a nível populacional em *D. magna*, assim como também mostra o estudo de Oliveira et al. (2015). Contudo, Nunes et al. (2014) indicou que em concentrações de 4,0 mg/L houve uma redução significativa na taxa de incremento populacional em *D. magna*. Rodríguez et al. (2007), Nunes et al. (2014) e Oliveira et al. (2015) reportaram que os crustáceos parecem particularmente sensíveis à exposição de paracetamol, hipotetizando que este composto parece estar envolvido na desregulação endócrina por interferência com o processo de muda. Todavia, é pertinente que se realize mais estudos sobre o potencial de perturbação do sistema endócrino de paracetamol e suas consequências ecológicas a longo prazo sobre a biodiversidade aquática, incluindo crustáceos. Não obstante este fenómeno, não houve evidências claras de alterações causadas no desempenho da descendência (F1). Contudo, foi observado um atraso reprodutivo significativo na descendência e uma redução aparente (não significativa)

do número de descendentes nos organismos expostos à última concentração. Embora de forma pouco evidente, estes dados consubstanciam um caso de efeito multigeracional, embora a uma concentração muito elevada (4 mg/L) e improvável de ocorrer em águas superficiais.

Os resultados obtidos nestes testes sugerem que altas concentrações destes tóxicos em ambientes aquáticos podem ter implicações drásticas na biodiversidade, afetando a sua sobrevivência, crescimento e reprodução destas espécies e eliminando-as se as concentrações permanecerem acima da sua tolerância. Contudo, não foi possível provar que os compostos causam efeitos multigeracionais (exceto de forma incipiente para o paracetamol). Este é um tema atual e importante, que tem sido abordado sobretudo à luz de estudos sobre substâncias disruptoras endócrinas (Brennan et al., 2006; Chen et al., 2014). No nosso entender, falta ainda informação acerca do potencial impacto multigeracional de outras substâncias, como metais, fármacos ou pesticidas. Nesse sentido, o desenho experimental aqui utilizado pode proporcionar uma ferramenta interessante para a avaliação regular da toxicidade multigeracional, sem que isso acarrete uma duração maior do ensaio experimental. Ao longo de 21 dias, foi possível levar a cabo um ensaio de reprodução em *Daphnia* e – simultaneamente – seguir o desempenho da descendência até à primeira reprodução.

A nova abordagem posta em ação revelou ser um procedimento vantajoso e inovador, pois possibilita um aumento de informação toxicológica que é gerada *a priori*, alertando os investigadores para o eventual efeito “carryover” (Jansen et al., 2011) de uma geração para a outra. Este tem sido um aspeto algo menosprezado pela literatura, mesmo considerando que há muito que se sabe a importância dos efeitos paternais no desempenho da descendência (Uller, 2008). No entanto, esse conceito tem sido pouco aplicado no campo da ecotoxicologia (ver ex.: (Antunes et al., 2004; Enserink et al., 1990; Loureiro et al., 2015)). Considerando este facto, o presente estudo foi um começo para uma contribuição significativa na obtenção de dados ecotoxicológicos mais completos e ecologicamente relevantes, com fim de poder avançar com novas perspetivas e soluções na proteção e conservação dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, S.C., Castro, B.B., and Gonçalves, F. (2004). Effect of food level on the acute and chronic responses of daphnids to lindane. *Environ Pollut* 127, 367-375.
- Antunes, S., Pereira, R., and Gonçalves, F. (2007). Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Arch Environ Con Tox* 53, 207-213.
- ASTM (1980). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. In Report E 729-80 (Philadelphia: American Society for Testing and Materials).
- ASTM (1997). Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. In Report E 1193-97 (Philadelphia: American Society for Testing and Materials).
- Baird, D.J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P., and Soares, A.M.V.M. (1989a). The *Daphnia* Bioassay - a Critique. *Hydrobiologia* 188, 403-406.
- Baird, D., Soares, A., Girling, A., Barber, I., Bradley, M., and Calow, P. (1989b). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. Paper presented at: Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology Lyngby, Denmark.
- Barata, C., Baird, D.J., Miñarro, A., and Soares, A.M. (2000). Do genotype responses always converge from lethal to nonlethal toxicant exposure levels? Hypothesis tested using clones of *Daphnia magna* Straus. *Environ Toxicol Chem* 19, 2314-2322.
- Bossuyt, B.T., De Schamphelaere, K.A., and Janssen, C.R. (2004). Using the biotic ligand model for predicting the acute sensitivity of cladoceran dominated communities to copper in natural surface waters. *Environ Sci Technol* 38, 5030-5037.
- Brennan, S.J., Brougham, C.A., Roche, J.J., and Fogarty, A.M. (2006). Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64, 49-55.
- Carson, R. (1962). *Silent spring* (Boston: Houghton Mifflin Harcourt).
- Carvalho, F.P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental science & policy* 9, 685-692.
- Chen, Y., Huang, J., Xing, L., Liu, H., Giesy, J.P., Yu, H., and Zhang, X. (2014). Effects of multigenerational exposures of *D. magna* to environmentally relevant concentrations of pentachlorophenol. *Environ Sci Pollut R* 21, 234-243.

- Coors, A., Vanoverbeke, J., De Bie, T., and De Meester, L. (2009). Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 95, 71-79.
- Daughton, C.G., and Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Persp* 107, 907.
- de Paiva Magalhaes, D., and Ferrao-Filho, A. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 12, 3.
- Duffus, J. (1980). *Environmental Toxicology* (New York: John Wiley & Sons).
- Ebert, D. (2005). *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia* (Bethesda (MD): National Library of Medicine (US): National Center for Biotechnology Information).
- Ellis, A.S., Johnson, T.M., and Bullen, T.D. (2002). Chromium isotopes and the fate of hexavalent chromium in the environment. *Science* 295, 2060-2062.
- Enserink, L., Luttmmer, W., and Maas-Diepeveen, H. (1990). Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquat Toxicol* 17, 15-25.
- Finney, D.J. (1971). *Probit analysis* (Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press).
- Forbes, V.E., and Forbes, T.L. (1994). *Ecotoxicology in theory and practice*, Vol 2 (Springer Science & Business Media).
- Hoffman, D.J., B.A. Rattner, G.A. Burton, Jr., J. Cairns, Jr. (1995). *Handbook of Ecotoxicology* (Boca Raton, Florida: CRC Press).
- ISO (1996). Water quality: determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test. In ISO International Standard 6341 (Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization).
- ISO (2000). Water quality: determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). In ISO International Standard 10706 (Geneva (Switzerland): International Organization for Standardization).
- Jansen, M., De Meester, L., Cielen, A., Buser, C.C., and Stoks, R. (2011). The interplay of past and current stress exposure on the water flea *Daphnia*. *Funct Ecol* 25, 974-982.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.-G., and Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major

- sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ Int* 33, 370-375.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., and Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36, 1202-1211.
- Kühn, R., Pattard, M., Pernak, K.-D., and Winter, A. (1989). Results of the harmful effects of selected water pollutants (anilines, phenols, aliphatic compounds) to *Daphnia magna*. *Water Research* 23, 495-499.
- Lampert, W. (2006). *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Polish journal of ecology* 54, 607-620.
- Loureiro, C., Castro, B.B., Pereira, J.L., and Gonçalves, F. (2011). Performance of standard media in toxicological assessments with *Daphnia magna*: chelators and ionic composition versus metal toxicity. *Ecotoxicology* 20, 139-148.
- Loureiro, C., Cuco, A.P., Claro, M.T., Santos, J.I., Pedrosa, M.A., Gonçalves, F., and Castro, B.B. (2015). Progressive acclimation alters interaction between salinity and temperature in experimental *Daphnia* populations. *Chemosphere* 139, 126-132.
- Loureiro, C., Pereira, J.L., Pedrosa, M.A., Gonçalves, F., and Castro, B.B. (2013). Competitive outcome of *Daphnia-Simocephalus* experimental microcosms: salinity versus priority effects. *Plos One* 8, e70572.
- Massarsky, A., Trudeau, V.L., and Moon, T.W. (2011). β -blockers as endocrine disruptors: the potential effects of human β -blockers on aquatic organisms. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 315, 251-265.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., and Boyce, M.S. (1986). Estimating Uncertainty in Population-Growth Rates - Jackknife Vs Bootstrap Techniques. *Ecology* 67, 1156-1166.
- Moriarty, F. (1983). *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems* (London: Academic Press).
- Newman, M.C. (2009). *Fundamentals of ecotoxicology* (CRC press).
- Nunes, B. (2010). Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos* 2.

- Nunes, B., Antunes, S.C., Santos, J., Martins, L., and Castro, B.B. (2014). Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotox Environ Safe* 107, 178-185.
- OECD (2004). *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. In OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) Test No 202 (Paris (France): OECD Publishing).
- OECD (2012). *Daphnia magna* Reproduction Test. In OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) Test No 211 (Paris (France): OECD Publishing).
- Oliveira, L.L., Antunes, S.C., Gonçalves, F., Rocha, O., and Nunes, B. (2015). Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. *Ecotox Environ Safe* 119, 123-131.
- Pimentel, D. (1996). Green revolution agriculture and chemical hazards. *Sci Total Environ* 188, S86-S98.
- Rand, G.M., and Petrocelli, S.R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications* (FMC Corp., Princeton, NJ).
- Roberts, P.H., and Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci Total Environ* 356, 143-153.
- Rodríguez, E.M., Medesani, D.A., and Fingerman, M. (2007). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146, 661-671.
- Santo, M.P.M.P.E. (2007). Avaliação do efeito do cobre na taxa de ingestão de Cladóceros. In Departamento de Biologia (Tese de Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia: Universidade de Aveiro).
- Soares, A., and Calow, P. (1993). *Progress in standardization of aquatic toxicity tests* (CRC Press).
- Stein, J.R., Hellebust, J.A., and Craigie, J. (1973). *Handbook of Phycological Methods: Physiological And Biochemical Methods, Vol 2* (Cambridge University Press).
- Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research* 32, 3245-3260.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotox Environ Safe* 1, 151-173.
- Uller, T. (2008). Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 432-438.

- UN (2013). World Population Prospects, The 2012 Revision, Highlights and Advance Tables, D.o.E.a.S.A. Population Division, ed. (United Nations, New York).
- USEPA (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5th edn EPA-821-R-02-012 edn (Washington: US Environmental Protection Agency).
- Wilson, C., and Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol Econ* 39, 449-462.